

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/053739

International filing date: 30 December 2004 (30.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 103 61 944.5  
Filing date: 31 December 2003 (31.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 March 2005 (07.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

10.02.05

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 61 944.5

**Anmeldetag:** 31. Dezember 2003

**Anmelder/Inhaber:** Viromics GmbH, 07749 Jena /DE

**Erstanmelder:** Professor Dr. Ulrich Schubert,  
07743 Jena/DE

**Bezeichnung:** Mittel zur Hemmung der Virusreplikation  
durch Regulation der Proteinfaltung

**IPC:** A 61 K, A 61 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 2. Februar 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

# Mittel zur Hemmung der Virusreplikation durch Regulation der Proteinfaltung

## Beschreibung

5

**[0001]** Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von akuten und chronischen Infektionen mit für Mensch und Tier pathogenen Viren, welche an der Zellmembran assemblieren und durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Hierzu zählen insbesondere Erreger von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagisches Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio oder Grippe. Gegenstand der Erfindung sind Mittel, die als Wirkstoffe Inhibitoren der Proteinfaltung enthalten. Hierzu zählen Inhibitoren von zellulären Faltungsenzymen (den enzymatischen Chaperonen) wie auch Substanzen, welche die Faltung von Proteinen durch chemische Chaperone stören. Durch diese Mittel werden die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen gestört. Im Ergebnis dessen wird die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Nachkommenviren unterbunden. Diese Mittel besitzen ein breites Wirkspektrum und können daher als neuartige Breitbandvirostatika zur Vorbeugung, beziehungsweise zur Therapie von unterschiedlichen Virusinfektionen eingesetzt werden.

## 1. Charakteristik des bekannten Standes

### 1.1 Prinzipien der Virusassemblierung

**[0002]** Die sogenannten späten Prozesse einer Virusreplikation beinhalten die Neusynthese von Virusproteinen, wobei in der Regel die Virusstrukturproteine zuerst nach Aktivierung der viralen Genexpression exprimiert werden. Diese Strukturproteine werden sodann in den Prozess der Assemblierung und der Formierung von viralen Unterstrukturen eingehen. Bei umhüllten Viren erfolgt in der Regel dieser Prozess an zellulären Membranen, meist an der Innenseite der Zellmembran. Alternativ besteht aber auch die Möglichkeit, dass Virusproteine zuerst im Zytoplasma der Zelle oder auch dem Zellkern in Virus-ähnliche Partikel assemblieren und später diese Virionen mit Prozessen der Freisetzung von der Zellmembran mit einer Lipidmembran umhüllt werden. Viren, welche an der Zellmembran assemblieren, werden in der Regel durch aktive Knospung (engl.: *budding*) von der Zellmembran freigesetzt. Dabei kommt es zur Formierung einer

4.

Virus-Knospe (engl: *bud*), welche aktiv von der Zellmembran ausgestülpt und dann letztendlich durch Abschnürung von der Zelloberfläche in Form eines Nachkommenvirus freigesetzt wird.

### 5 1.1.1 Darstellung der Assemblierung, Freisetzung und Reifung von Viren am Beispiel von Humanem Immundefizienzviren (HIV)

[0003] Die Prinzipien der späten Prozesse der Virusreplikation sollen am Beispiel von HIV dargestellt werden. Hauptkomponenten der HIV-Strukturproteine werden in Form von drei Polyproteinen translatiert: Gag und Gag-Pol für die inneren Core-Proteine und viralen Enzyme sowie Env für die viralen Hüllproteine. Membran-targeting-Signale in der NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne von Gag sind für den Transport von Gag an die Zellmembran jedoch entscheidend. Im Falle von HIV-1 resultiert die vollständige proteolytische Prozessierung des Gag Polyproteins Pr55 in der Formierung des Matrix (MA), des Capsid (CA) sowie des Nucleocapsids (NC) und des COOH-terminalen p6<sup>gag</sup> Proteins. HIV-Virionen werden generell als unreife nicht-infektiöse Viruspartikel von der Plasmamembran abgeschnürt; dieser Prozess wird als Virusbudding bezeichnet. Unmittelbar nach oder auch während des Buddings beginnt mit der Aktivierung der viralen Protease (PR) die proteolytische Prozessierung von Gag und Gag-Pol-Polyproteinen. Die proteolytische Reifung der Virionen geht einher mit morphologischen Veränderungen. Charakteristisch dabei ist die Kondensierung des inneren Cores, welche in der Formierung eines für das reife Virus typischen kegelförmigen Core-Zylinders resultiert (zusammengefasst in Kräusslich and Welker, 1996; Swanstrom and Wills, 1997).

## 25 1.2. Prinzipien der Proteinfaltung

### 1.2.1 Molekulare Chaperone

#### 1.2.2. Chemische Chaperone

[0004] Niedermolekulare Substanzen, wie zum Beispiel Glycerol, Trimethylamine, zum Beispiel Trimethylamin-N-oxid (TMAO), verschiedene Aminosäurederivate, wie zum Beispiel Betain, wie auch deuteriertes Wasser (D<sub>2</sub>O) wurden als "chemische Chaperone" beschrieben. Sie sind dafür bekannt, dass sie durch Regulation der Menge an Proteinstruktur-gebundenem Wasser die Proteinfaltung regulieren (Perlmutter, 2002; Diamant et al., 2001; Gekko & Timasheff, 1981.)

### 1.2.3. Inhibitoren von Chaperonen

[0005] Es ist bekannt, dass Geldanamycin mit dem Chaperon Hsp90 interagiert und dadurch die Faltung von Proteinen, insbesondere nach Hitzeschock reguliert. Geldanamycin verhindert speziell die Dissoziation von Hsp90 von dem Substrat und bewirkt dadurch dessen Inaktivierung (Whitesell *et al.* 1994; Schneider *et al.* 1996).

[0006] Deoxyspergualin (DSG, ein  $\alpha$ -hydroxyglycyl,7-guanidinoheptanoyl peptidomimetic) ist ein synthetisches Analog des natürlich vorkommenden Spergualins, welches aus *Bacillus laterosporus* isoliert wurde und potente immunsuppressive Wirkungen zeigt (Takeuchi *et al.*, 1981., Nemoto *et al.*, 1987, Tepper *et al.*, 1991., Dickneite *et al.*, 1987). DSG interagiert sowohl mit den Proteinen der Hsp70- und der Hsp90-Familien als auch mit den konstitutiv exprimierten Proteinen der Hsc70-Familie (Nadler *et al.*, 1992).

[0007] Weitere Inhibitoren von molekularen Chaperonen sind Natrium-4-phenylbutyrate (4-PBA), welche Hsc70 blockieren, sowie Herbimycin A, das Hsp90 blockiert.

### 1.2.4. Störung der Proteinfaltung durch physikalische Einflüsse (Hitzeschock)

20

## 2. Das Wesen der Erfindung

[0008] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Verfügung zu stellen, die zur Behandlung von akuten und chronischen Infektionen mit für Mensch und Tier pathogenen Viren geeignet sind. Diesen Viren ist zu eigen, dass sie in der Zelle, vorzugsweise an der Zellmembran, assemblieren und durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Hierzu zählen insbesondere Erreger von Infektionserkrankungen, wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagisches Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio, Herpesvirusinfektionen oder Grippe. Gegenstand der Erfindung sind Mittel, die als Wirkstoffe Inhibitoren der Proteinfaltung enthalten. Hierzu zählen Inhibitoren von zellulären Faltungsenzymen (den enzymatischen Chaperonen) wie auch Substanzen, welche die Faltung von Proteinen durch chemische Chaperone stören. Durch diese Mittel werden die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen gestört, in deren Ergebnis die Freisetzung und die

6  
Produktion von infektiösen Nachkommenviren unterbunden wird. Diese Mittel besitzen ein breites Wirkspektrum und können daher als neuartige Breitbandvirostatika zur Vorbeugung, beziehungsweise zur Therapie von unterschiedlichen Virusinfektionen eingesetzt werden.

5 **[0009]** Die Aufgabe der Erfindung wurde durch den Einsatz von Inhibitoren von Proteinfaltungsenzymen gelöst. Insbesondere finden dabei Inhibitoren von zellulären Chaperonen wie zum Beispiel der Hitzeschockproteine (*heat shock proteins* (hsp)) Anwendung. Hierzu zählen Mittel, welche die Aktivitäten der Hitzeschockproteine Hsp40, Hsp70, 90, Hsp27 und Hsc70 hemmen, zum Beispiel  
10 die Substanzen Geldanamycin and Deoxyspergualin, welche die Proteine der Hsp90- und der Hsp/Hsc70-Familien hemmen.

**[0010]** Es sind erfindungsgemäß Mittel zur Behandlung von unterschiedlichen Virus-Infektionen entwickelt worden, die als wirksame Komponenten Inhibitoren enthalten, welche molekulare Chaperone blockieren. Hierzu zählen Substanze wie  
15 zum Beispiel Geldanamycin, Deoxyspergualin, 4-PBA, oder Herbimycin A. Ebenfalls werden Substanzen eingesetzt, welche in Form von chemischen Chaperonen die Proteinkonformation und die Faltung von viralen Proteinen regulieren, stören oder blockieren. Hierzu zählen Substanzen wie zum Beispiel Glyzerol, Trimethylamine, Betain, Trehalose oder deuteriertes Wasser (D<sub>2</sub>O).

20 **[0011]** Das Wesen der Erfindung geht auch aus den Patentansprüchen hervor.

**[0012]** Allen späten Prozessen der Virusreplikation, wie Assemblierung, Knospung, proteolytische Reifung und Virusfreisetzung, ist gemeinsam, dass die Virusstrukturproteine in der Regel als Vorläuferproteine in Form von Polyproteinen gebildet werden, die dann durch die Aktivität von Proteasen, welche entweder von  
25 der Wirtszelle stammen, meist aber mindestens eine viral kodierte Protease darstellen, in die sogenannten reifen Virusstrukturproteine gespalteten werden. Dieser Prozess wird allgemein als Virusreifung bezeichnet. Die geordneten und fein aufeinander abgestimmten Prozesse der Assemblierung, der Reifung, der Knospung und der Freisetzung sind entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Bildung  
30 von infektiösen Nachkommenviren. Die geringste Störung dieser vielschichtigen Prozesse kann die Infektiosität und/oder die Freisetzung von Nachkommenviren wesentlich stören. Alle diese Prozesse haben eines gemeinsam: Sie beinhalten vielfältige und auf einander abgestimmte Prozesse der Proteinfaltung. Das heißt, dass im Prozess der Assemblierung, der Reifung und der Knospung die  
35 ursprüngliche Proteinkonformation der Virusstrukturproteine, so wie diese am

Ribosom synthetisiert wurden, nicht erhalten bleibt, sondern die sekundäre wie auch die tertiäre Proteinstruktur einzelner Proteinabschnitte und/oder vom gesamten Virusprotein sich im Prozess der Assemblierung und Reifung mehrfach ändert.

5 **[0013]** Alle Methoden, welche die Proteinfaltungsprozesse, das heißt die Umlagerung einzelner Proteinstrukturen stören, werden daher auch die Formierung von infektiösen Nachkommenviren verhindern. Dies kann entweder indirekt durch Beeinflussung von Faltungsenzymen, den zellulären oder auch molekularen Chaperonen erfolgen. Direkte Einflüsse auf die Proteinfaltung kann durch  
10 Substanzen oder physikalische Einflüssen ausgelöst werden, welche direkt die Proteinkonformation regulieren. Sogenannte chemische Chaperone sind in der Regel niedermolekulare Verbindungen, welche die Menge des strukturgebundenen Wassers und der Oberfläche von Proteinmolekülen regulieren und dadurch die Stabilität der Sekundärstrukturen beeinflussen.

15

**[0014]** Anwendungsgebiete sind sowohl die Behandlung als auch die Vorbeugung von viralen Infektionen. Es sind erfindungsgemäß Mittel zur Behandlung von unterschiedlichen Virusinfektionen entwickelt worden, die als wirksame Inhibitoren von Faltungsenzymen chemische Chaperone in pharmazeutischen Zubereitungen  
20 enthalten. Die erfindungsgemäßen neuartigen Mittel eignen sich zur Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit unterschiedlichen humanpathogenen oder auch tierpathogenen Viren. Im Vordergrund stehen Erreger von chronischen Infektionserkrankungen, wie zum Beispiel AIDS (HIV-1 und HIV-2), von Hepatitis (HCV und HBV), von dem Erreger des "Severe Acute Respiratory Syndrom" (SARS),  
25 dem SARS-CoV (Coronavirus); von Pockenviren, von Erregern des viralen hämorrhagisches Fiebers (VHF), wie zum Beispiel den Ebola-Viren als Vertreter der Familie der Filoviridae; von Grippe-Erregern, wie zum Beispiel dem Influenza-A-Virus.

**[0015]** Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung können in  
30 infizierten Zellen verschiedene anti-virale Wirkungen ausgelöst werden. Diese betreffen zum Beispiel die Induktion von Apoptose, welche das bevorzugte Absterben von infizierten Zellen im Organismus bewirken. Dieser Prozess wird insbesondere durch die Akkumulation von unreifen und in der Assemblierung gestörten Virusproteinen bewirkt. Gleichzeitig werden durch Inhibierung der  
35 Assemblierung und der Reifung von Virusproteinen die Freisetzung und die

Produktion von infektiösen Nachkommenviren gestört. In der Gesamtsumme dieser Wirkung kann eine therapeutische Wirkung durch Blockade der Virusreplikation und die Entfernung von Virus-produzierender Zellen im Organismus bewirkt werden.

[0016] Die Aufgaben der Erfindung werden durch den Einsatz von mindestens einem Inhibitor von molekularen Chaperonen und / oder mindestens einem chemischen Chaperon gelöst. Es sind erfindungsgemäß Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen entwickelt worden, die als eine wirksame Komponente Inhibitoren der Proteinfaltung in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Inhibitoren der Proteinfaltung Substanzen eingesetzt, welche die Aktivitäten von molekularen Chaperonen der Wirtszelle hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen. Hierzu zählen Mittel, welche die Aktivitäten der Hitzeschockproteine Hsp40, Hsp70, 90, Hsp27 und Hsc70 hemmen, zum Beispiel die Substanzen Geldanamycin, Deoxyspergualin, 4-PBA, oder Herbimycin A.

[0017] Eine Variante der Erfindung besteht darin, dass als chemischen Chaperone Substanzen wie zum Beispiel Glycerol, Trimethylamine, Betain, Trehalose oder deuteriertes Wasser (D<sub>2</sub>O) eingesetzt werden.

[0018] In allen bevorzugten Anwendungen der Erfindung werden diese Inhibitoren und Substanzen von Zellen höherer Eukaryonten aufgenommen und nach Zellaufnahme entweder indirekt die Aktivitäten von molekularen Chaperonen der Wirtszellen blockieren oder in Form von chemischen Chaperonen direkt die Faltung von Virusproteinen stören.

[0019] Erfindungsgemäß werden als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder als chemische Chaperone Substanzen eingesetzt, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, in verkapselter Form mit oder ohne Zellspezifität-tragende Veränderungen oder anderweitig verabreicht werden und die aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität und/oder hohe Selektivität für bestimmte Zellen und Organe aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relativ hohe metabolische Halbwertszeit und eine relativ geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

[0020] Als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder als chemische Chaperone werden des weiteren Substanzen eingesetzt, die in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden, durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder total-



synthetisch hergestellt werden oder durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert oder durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder in Mikroorganismen hergestellt werden.

5 **[0021]** Mit den Inhibitoren zellulärer Chaperone oder den chemische Chaperonen werden erfindungsgemäß Mittel zur Verfügung gestellt, die überraschenderweise durch die Blockierung der Replikation von unterschiedlichen Viren die Produktion von infektiösen Nachkommen-Viren beeinträchtigen und damit die Ausbreitung einer systemischen Infektion im Organismus verhindern sowie weiterhin

- 10 - die Freisetzung von infektiösen Viren aus infizierten Zellen blockieren,
- die Ausbreitung einer Virus-Infektion im Organismus begrenzen,
- zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "*viral load*") von symptomlosen Virus-infizierten Personen beitragen,
- 15 - die Etablierung einer systemischen Virus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen biologischen Proben, infizierten Personen oder deren näherer Umgebung verhindern,
- die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen mit unterdrücken und den Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel, welche in Kombination mit den Inhibitoren zellulärer Chaperone oder chemischer Chaperone mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöhen.
- 20

**[0022]** Die Inhibitoren zellulärer Chaperone oder die chemischen Chaperone können auch in Kombination mit anderen anti-Virus-Medikamenten und sonstigen Therapieschemata eingesetzt werden, z.B. Interferon alpha/beta/gamma und Varianten hiervon (zum Beispiel pegylierte Interferone), Interleukine, Nukelosidanaloga (Lamivudine, Cidovir, Ribavirin und andere), Steroide, Thymidinkinase-Hemmern (z.B. Ganzyklovir), Plasma-Austausch, Thymosin alpha 1, Impfstoffe, passive und aktive Vakzinierung, therapeutische und prophylaktische Vakzinierung, Glycyrrhizin, Stammzelltransplantation, Organtransplantationen, Nahrungstherapie, Immunsuppressiva, Cyclosporine und Derivate hiervon, Amanditin und Derivate, Interleukine und andere Cytokine, nicht Proteasom-selektive Protease-Inhibitoren, Azathioprin, Hämodialyse sowie hoch aktive antiretrovirale Therapie (highly active antiretroviral therapy, "HAART") bei Co-Infektionen von HCV und HIV. Da diese Inhibitoren auch anti-virale Wirkung auf

35

10

HIV ausüben, ist eine Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen, insbesondere in Kombination mit HAART-Therapie, ein Anwendungsschwerpunkt der Erfindung.

**[0023]** Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Erfindung liegt auch in einem kombinierten Einsatz von bekannten und neuen Elementen, den Inhibitoren zellulärer Chaperone einerseits sowie den chemischen Chaperonen andererseits. Weiterhin können diese neuen Mittel, welche die Proteinfaltung von Virusproteinen beeinflussen, auch in Kombination mit anderen, bereits bekannten antiviralen Chemotherapeutika angewendet werden.

**[0024]** Erfindungsgemäß finden die zellulären Chaperone einerseits sowie die chemischen Chaperone andererseits Verwendungen zur Herstellung von Mitteln zur Bekämpfung / Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen sowie von pathologischen Erscheinungen, welche

- die durch SARS-CoV und verwandten Coronaviren verursacht werden,
- die durch virale hämorrhagische Fieber (VHF) in Menschen und Tieren, insbesondere in non-humanen Primaten (Affen) und ihre verwandten Tieren ausgelöst werden, wie zum Beispiel Infektionen mit den Vertretern der Filoviren, dem Ebolavirus und Marburgvirus oder die durch Infektionen mit Lassa-Virus oder Krim/Kongo-hämorrhagischem-Fieber-Virus verursacht werden.

**[0025]** Für die bevorzugte Anwendung der erfindungsgemäß neuartigen antiviralen Mittel bei der Behandlung von viralen Hepatiden wird festgestellt, dass die erfindungsgemäße Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen in der Hemmung des Eintritts/Internalisierung und Uncoating Prozesses von *Flaviviridae* sowie in der Hemmung der Assemblierung, Reifung und Freisetzung von Nachkommenviren besteht. Die Verwendung zur Hemmung der Vermehrung von *Flaviviridae* erfolgt nach den Mechanismen

- a) Blockierung/Reduktion der Assemblierung und Freisetzung von neuen Virionen,
- b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen,
- c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in kultivierten Zellen.

M

**[0026]** Dies impliziert, dass die neuartigen Chaperoninhibitoren die Ausbreitung von Nachkommenviren in infizierten Organen unterdrücken.

**[0027]** Eine weitere Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen liegt in der Induktion des Absterbens von Hepato-  
5 Karzinomzellen, in der Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzell-Karzinomen sowie in der Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

**[0028]** Eine weitere Verwendung besteht in der Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von

- 10 - HCV-induzierter Leberzirrhose und/oder
- HCV-induzierten Leberzellkarzinomen
- Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen
- genetisch bedingten Leberkarzinomen und/oder
- durch die Umwelt bedingten Leberkarzinomen.)

15 **[0029]** Eine weitere Verwendung liegt in der gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, die infolge einer

- HCV-Infektion und/oder
- HCV-HBV-Koinfektion sowie durch
- HCV-HBV-HDV-Koinfektionen

20 entstehen.

**[0030]** Weiterhin finden Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Verwendung zur

- 25 - Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HCV-infizierten Patienten
- Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 und anderer HCC-relevanter Tumorsuppressorproteine
- Leberzellregeneration bei Patienten mit Leberentzündung
- 30 - Reduktion der Anzahl infizierter Virus-produzierender Zellen im Leberzellgewebe
- Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer HCV-Infektion
- 35 *in vivo*

12

- Behandlung von Koinfektionen mit HCV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2
- Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie
- 5 - Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen
- Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation
- Behandlung und Bekämpfung von Hepatitiden in Kombination untereinander
- 10 - Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die Restvirus haben und sich neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten
- Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus oder zur
- 15 - Minderung oder Eliminierung der Leberentzündung durch Immunsystem-vermittelte Mechanismen.

**[0031]** Eine weitere Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen besteht in der Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virusinfektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Virus-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

**[0032]** Eine weitere Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen ist die Vorbeugung einer Hepatitis-Virusinfektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, zum Beispiel bei Ärzten und anderem Risiko-Personal, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitis-Viren, in der Krankenbehandlung oder für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

**[0033]** Eine weitere Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen besteht in der Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen sowie bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und einige Zeit nach der Transplantation. Die Gabe dieser Mittel ist angezeigt sowohl für die Hochrisikosituation bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und wo

sich neue Organe infizieren können, als auch für die Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

**[0034]** Eine weitere Verwendung besteht in der Behandlung von HCV-induzierten Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der gemischten TypII Kryoglobulinämie.

5 **[0035]** Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit bereits in der anti-HCV-Therapie verwendeten Therapeutika.

**[0036]** Eine wesentliche Anwendung besteht in der Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zur Herstellung von Mitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und  
10 Replikation von Hepatitisviren sowie zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatitiden.

**[0037]** Eine weitere Anwendung besteht darin, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die post-translationale Modifikation der Virus-Strukturproteine verändern und somit die Freisetzung und Infektiosität  
15 von Flaviviridae herabsetzen oder blockieren.

**[0038]** Eine weitere Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen besteht in der Behandlung von mit Flavivirus infizierten Personen, also zum Beispiel Personen, die akut an West-Nil-, Gelbfieber, Dengue-Fieber (7-Tage-Fieber oder Dengue Hämorrhagischem Fieber) oder Arbovirus-  
20 Encephalitis erkrankt sind. Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen können auch hier zur Vorbeugung einer Virusinfektion bei Risikopersonen wie Ärzten oder Reisenden in hochendemische Gebiete für West-Nil-Virus, Dengue-Fieber-Virus, Gelbfieber-Virus oder FSME-Virus eingesetzt werden.

**[0039]** Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Behandlung von Pestivirus-  
25 infizierten Stalltieren mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen.

**[0040]** Gleichzeitig ist die Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auch neuartig hinsichtlich des Anwendungsprinzips.  
30 Bislang sind keine Substanzen / Prinzipien / Methoden bekannt, welche späte Prozesse der Replikation von Hepadnaviren, speziell der Freisetzung von infektiösen Virionen beeinflussen. Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zur Blockierung der Replikation von Hepatitis-Viren führt. Im Vergleich zu bisherigen anti-viralen  
35 Methoden der Behandlung von Hepatitis-Infektionen, welche essentielle

Komponenten des Virus direkt treffen, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen bei Applikation von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen in der Behandlung von Hepadnavirus-Infektionen um Größenordnung geringer. Die Neuartigkeit dieses Wirkprinzips von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zeigt sich auch in der Tatsache, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen ein breites Wirkungsspektrum gegenüber unterschiedlichen Hepatitis-Viren (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV) besitzen.

**[0041]** Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen, die zwar nicht den Viruseintritt, wohl aber die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits mit Hepadnaviren infizierten Zellen verhindern wie auch die Freisetzung des virus-kodierten e-Antigens, welches für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendig ist, vermindert. Dadurch wird wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) sowie des für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendigen e-Antigens und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert.

**[0042]** In der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt bei gleichzeitigem Zelltod von Virus-produzierenden Karzinomzellen im Falle einer *in vivo* Anwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Menge an infektiösen Virionen in einem mit Hepadnaviren infizierten Organismus verringert. Somit wird insgesamt die Zahl infizierter Produzentenzellen im Leberzellgewebe reduziert. Dies macht die Anwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen allein oder in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika attraktiv.

**[0043]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen späte Prozesse im Replikationszyklus von Retroviren hemmen. Dabei wurde spezifisch festgestellt, dass sich die erfindungsgemäße Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen dazu eignet, die Assemblierung und Freisetzung von Virionen von der Zelloberfläche zu hemmen. Dabei tritt eine Hemmung der proteolytischen

15  
Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease ein. Ebenfalls ist die Infektiosität der freigesetzten Virionen reduziert. In Folge dieser neuartigen Aktivitäten können Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Virusreplikation unterdrücken.

5 **[0044]** Die Hemmung folgender Retroviren ist möglich: Spumaviren, Mammalian-C-Typ-Oncoviren, BLV (Bovine Leukemia Virus), HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus), Leukämieviren, RSV (Rous Sarcoma Virus) oder Lentiviren. Als Beispiele für Leukämieviren kommen BLV, HTLV-I oder HTLV-II in Frage. Beispiele für Lentiviren sind Humanes Immundefizienzvirus Type 1 (HIV-1), Humanes Immundefizienzvirus  
10 Type 2 (HIV 2), Affenimmundefizienzvirus (SIV), Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) oder Rinder-Immundefizienzvirus (BIV).

**[0045]** Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen für die Bekämpfung /  
15 Behandlung von Erkrankungen/pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit Retroviren verursacht wurden. Die Erkrankungen/pathologischen Erscheinungen können durch Infektionen mit Leukämieviren, humanen T-Zell-Leukämieviren HTLV-I und HTLV-II oder durch Infektionen mit Lentiviren verursacht werden.

**[0046]** Ein weiteres Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Bekämpfung /  
20 Behandlung von AIDS, sowohl in der frühen symptomlosen als auch in der fortgeschrittenen Krankheitsphase, mittels Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen. Diese Substanzen können auch in Kombination mit anderen anti-retroviralen Medikamenten eingesetzt werden, z.B. mit Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease. Auch die Kombination mit  
25 anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen ist möglich.

**[0047]** Eine weitere Verwendung ergibt sich durch die Kombination mit intrazellulärer Immunisierung, wie z.B. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und/oder in periphere CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

30

**[0048]** Eine Verhinderung des Krankheitsausbruches und eine Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2-infizierten Personen ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich. Weiterhin können Inhibitoren zellulärer  
35 Chaperone oder von chemischen Chaperonen zur Behandlung / Bekämpfung /

Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia- und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns eingesetzt werden. Eine weitere Verwendung ist die Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1/HIV-2-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

**[0049]** Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird am Beispiel von HIV-1 und HIV-2 gezeigt. Es wird dargestellt, dass unmittelbar nach Zugabe von verschiedenen Substanzklassen von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Produktion von infektiösen Viruspartikeln gehemmt wird.

**[0050]** Erfindungsgemäß wird dieses Phänomen sowohl in HIV-1 infizierten permanenten Kulturen von CD4<sup>+</sup> humanen T-Zellen als auch in Kulturen von humanen Fibroblasten (HeLa-Zellen) transfiziert mit infektiöser proviraler DNA HIV-1 und HIV-2 beobachtet und hier näher beschrieben. Aufgrund dieser neuartigen Aktivitäten von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen ist davon auszugehen, dass die Applikation von *in vivo* verträglichen Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Infektionsausbreitung von HIV im Organismus unterdrücken oder vollständig eliminieren kann.

**[0051]** Erfindungsgemäß wird gezeigt, dass der hemmende Effekt von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auf die HIV-Replikation folgende Mechanismen beinhaltet:

1. Blockierung/Reduktion der proteolytischen Prozessierung der Gag-Polyproteine durch die HIV-1 PR;
2. Blockierung/Reduktion von Freisetzung und Budding von neuen Virionen an der Zellmembran;
3. Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen;
4. Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung von HIV-1 in Kultur CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

**[0052]** Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfindung verschiedene proteinchemische, molekular-virologische und morphologische Studien an HIV-1 durchgeführt. Erfindungsgemäß wird der durch Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen ausgelöste Defekt in der Gag-Prozessierung mittels biochemischer Methoden dargestellt. Dazu wurde eine metabolische Puls-Markierung von HIV-Proteinen mittels radioaktiver Aminosäuren, gefolgt von Inkubation (Chase) in nicht-radioaktivem Medium, durchgeführt. Die dabei



17

gewonnenen Informationen ermöglichen die Darstellung des hemmenden Effektes von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auf Gag-Prozessierung und Budding von HIV-Virionen innerhalb kurzer Zeit-Kinetiken, die Teilabschnitten eines HIV-Replikationszyklus entsprechen.

5 **[0053]** Erfindungsgemäß wird dargestellt, dass die hemmende Wirkung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auf die HIV-Assemblierung und Freisetzung nicht die enzymatische Aktivität der HIV-1 PR trifft. Durch *in vitro* Prozessierungsstudien an isolierten Gag- und PR-Molekülen von HIV-1 wird gezeigt, dass verschiedene Substanzklassen von Inhibitoren zellulärer  
10 Chaperone oder von chemischen Chaperonen keinerlei Einfluss auf die PR-Aktivität ausüben.

**[0054]** Ferner wird erfindungsgemäß die durch Wirkung der Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen reduzierte Infektiosität freigesetzter unreifer HIV-Virionen mittels End-Punkt-Titrationsstudien in CD4<sup>+</sup> T-Zellkulturen  
15 dargestellt. Dabei wird gezeigt, dass allein eine Inkubation mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen für sechs Stunden (entspricht etwa einem Drittel eines HIV-Replikationszyklus in der Targetzelle) zu einer 10-fachen Reduktion im Virus-Titer und zu einer 50-fachen Reduktion der spezifischen Infektiosität des freigesetzten Viruspartikels führt.

20 **[0055]** Erfindungsgemäß wird der Einfluss von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auf die Morphologie von HIV-1-Virionen im Assemblierungs- und Budding-Prozess an der Zellmembran untersucht. Zur Lösung dieser Aufgabe wird hochauflösende Transmissions-Elektronenmikroskopie an HIV-1-infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dabei wird festgestellt, dass die  
25 Behandlung mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen für einen Zeitraum von etwa 5 Stunden zu folgenden Veränderungen in der Virusmorphologie führt:

1. Der Arrest von assemblierenden Virionen in der Budding-Phase ist signifikant erhöht;
- 30 2. die Ablösung der Virionen von der Zelloberfläche ist gestört, und es kommt zur Ausbildung von Virus-Membran-Verbindungen ("Stalk-formation");
3. die absoluten Zahl von Viruspartikeln an der Zelloberfläche ist reduziert;
4. die relative Zahl von unreifen, zellfreien Virionen ist erhöht.

[0056] Erfindungsgemäß wird der inhibitorische Effekt von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auf die Virusreplikation in Kulturen HIV-1-infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen demonstriert. Die Zugabe von nanoM-Konzentrationen an verschiedenen Substanzklassen von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen verhindert die Infektionsausbreitung und bewirkt das Ausbleiben einer produktiven Virusreplikation.

[0057] Das in der Erfindungsbeschreibung dargestellte Prinzip der Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zur Blockierung einer HIV-Infektion ist neuartig in Hinsicht auf die Verwendung einer bereits bekannten Substanzklasse (den Inhibitoren zellulärer Chaperone oder den chemischen Chaperonen) für eine neue Aktivität (der Blockierung von Gag-Prozessierung und Freisetzung von Retroviren).

[0058] Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zur Blockierung von HIV und anderen Retroviren nicht das Virus selber, sondern Mechanismen beeinflusst, die in allen Wirtszellen des Virus konserviert sind. Im Vergleich zu bisherigen anti-retroviralen Methoden, die essentielle Komponenten des Virus selber treffen, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen bei Applikation von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen um Größenordnung geringer. Die Neuartigkeit dieses Wirkprinzips von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen zeigt sich auch in der Tatsache, dass diese Inhibitoren ein breites Wirkungsspektrum gegenüber unterschiedlichen Isolaten von HIV-1 und HIV-2 besitzen. Der inhibitorische Effekt wurde im Rahmen der Erfindung mit gleicher Intensität bei verschiedenen primären als auch Zellkultur-adaptierten T-Zelltrophen und Makrophagen-trophen HIV-Isolaten beobachtet.

[0059] Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen, die zwar nicht den Viruseintritt, wohl aber die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits infizierten Zellen verhindern. Dadurch sollte wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert werden können. Die mittlere Überlebenszeit einer akut HIV-infizierten T-Zelle beträgt wenige Tage. Zudem ist bekannt, dass die Hemmung der Virusfreisetzung und die damit verbundene Akkumulation von zum Teil toxischen HIV-Proteinen (insbesondere den Env-Hüllproteinen) zu einem verstärkten zytopathischen Effekt und dadurch zum

19

schnelleren Absterben der infizierten Zelle führt. Neben der Neuinfektion sollte die Wirkung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auch zu einem schnelleren Absterben von bereits infizierten Zellen führen.

5 **[0060]** In der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt bei gleichzeitigem Zelltod der Virus-produzierenden Zellen im Falle einer *in vivo* Anwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Menge an infektiösen Virionen im peripheren Blut  
10 und gleichzeitig die Zahl infizierter Produzentenzellen von HIV im Gesamt-Organismus reduziert. Dies macht die Anwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen allein oder in Kombination mit bereits in der anti-retroviralen Therapie verwendeten Enzymhemmern attraktiv.

15 **[0061]** Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird an den Beispielen von HIV-Viren gezeigt. In Kontrollversuchen wurde zunächst dargestellt, dass eine Vorbehandlung der Target-Zellen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder HeLa-Zellen) mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen verschiedener Substanzklassen von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen keinen Einfluss auf die  
20 Lebensfähigkeit der Wirtszelle ausübt.

**[0062]** Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfindung molekularvirologische, biochemische, immunbiologische und elektronenmikroskopische Studien an infizierten Zellen durchgeführt, die mit  
25 verschiedenen Viren infiziert oder mit viralen RNA- und oder DNA-Molekülen transfiziert wurden. Erfindungsgemäß wurden die durch Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen ausgelösten Defekte durch folgende Mittel und Verfahren bestimmt: (i) Viruspräparationen und Bestimmung von infektiösen Titern; (ii) Virus-Endpunkt-Titrationsverfahren durch mikroskopische Detektion infektiöser viraler Partikel über Plaque-Formation oder  
30 Immunfärbeverfahren; (iii) cDNA-Konstrukte durch *in vitro* Transkription; (IV) RNase-Protektionsverfahren zur Detektion/Quantifizierung viraler RNA-Moleküle; (v) Immunofluoreszenz-Tests zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit viraler RNA-Moleküle bzw. zur Bestimmung der Ausbreitung einer Infektion; (vi) Elektronenmikroskopische Verfahren zur Untersuchung der Morphologie viraler  
35 Partikel während und nach dem Infektionsvorgang. (vii) Pulse-Chase-

20

Markierungsverfahren / in vitro Translationsverfahren zur Darstellung von Virusstrukturproteinen in vivo und in vitro; (vii) Western-Blot-Studien und Immunoprecipitationsverfahren an viralen Proteinen.

- 5 **[0063]** Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

### **Ausführungsbeispiele**

10

#### Beispiel 1:

- [0064]** Die Behandlung von *Flaviviridae*-infizierten Zellkulturen mit moderaten Konzentrationen von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen reduziert drastisch die Freisetzung und Ausbreitung infektiöser  
15 Nachkommenviren.

#### Beispiel 2:

- [0065]** Die Behandlung von *Flaviviridae*-infizierten Zellen mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen führt zu Unterschieden in  
20 der Anzahl der in infizierten Zellen detektierbaren Viruspartikel, zu Veränderungen des Verhältnisses kompletter zu nicht-kompletter Virionen sowie zu Veränderungen in der Morphologie sekretierter Nachkommenviren.

#### Beispiel 3:

- 25 **[0066]** Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen haben einen Effekt auf die Prozessierung und die Modifikation der Strukturproteine von BVDV und HCV.

#### Beispiel 4:

- 30 **[0067]** Behandlung von HIV-1-infizierten Zellen mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen reduziert die Infektiosität von freigesetzten Viruspartikeln.

#### Beispiel 5:

**[0068]** Elektronenmikroskopische Analyse HIV-1-infizierter MT-4-Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen.

Beispiel 6:

5 **[0069]** Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen hemmen Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von infizierten T-Zellkulturen und transfizierten HeLa-Zellen.

Beispiel 7:

10 **[0070]** Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen hemmen HIV-1 Replikation in Zellkultur.

Beispiel 8:

**[0071]** Inhibition der Replikation von SARS-CoV in Vero-Zellen durch Inhibitoren  
15 zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen.

**Literatur:**

- 20 Diamant S., Eliahu N, Rosenthal D, Goloubinoff P. 2001. Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones *in Vitro* and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *J. Biol. Chem.* 276 (43): 39586-39591.
- 25 Gekko K, Timasheff S. 1981. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry.* 20:4667-4676.
- Kräusslich, H-G; Welker, R (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:25-63.
- 30 Nadler S., Tepper M., Schacter B., Mazzucco C. 1992. Interaction of the Immunosuppressant Deoxyspergualine with a Member of the Hsp70 Family of Heat Shock Proteins. *Science* 258: 484-486.
- 35 Perlmutter D. 2002. Chemical Chaperones: A Pharmacological Strategy for Disorders of Protein Folding and Trafficking. *Pediatric Research.* 52 (6) 832-836.
- Schneider *et al.* 1996, *PNAS* 93:14536-14541.
- 40 Whitesell *et al.* 1994, *PNAS* 91:8324:832.

## Patentansprüche

1. Mittel zur Hemmung der Assemblierung und der Reifung von Virusstrukturproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponente mindestens einen Inhibitor zellulärer Chaperone oder von einem chemischen Chaperon in einer pharmazeutischen Zubereitung enthalten.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Faltung und proteolytische Reifung von Virusproteinen hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen und dadurch die Freisetzung und die Replikation von Viren hemmen, speziell von Erregern von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagisches Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio, Herpesvirusinfektionen oder Grippe.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten von molekularen Faltungsenzymen der Wirtszellen beeinflussen.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die von Zellen höherer Eukaryonten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme die Proteinfaltung von Virusstrukturproteinen blockieren.
5. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutischen Zubereitungen neben Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen auch andere Wirkstoffe, insbesondere Chemotherapeutika, enthalten, die bekannte antivirale Wirkungen auslösen.
6. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragenden

Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

7. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die

- a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder
- b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder
- c) total-synthetisch hergestellt werden oder
- d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden.

8. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen stören und dadurch die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Nachkommenviren unterbinden.

9. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Faltung von viralen Proteinen regulieren, stören oder blockieren.

10. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die späte Prozessen der Virusreplikation wie Assemblierung, Knospung, proteolytische Reifung und Virusfreisetzung stören.

11. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die proteolytische Prozessierung von Vorläuferproteinen der viralen Polyproteine stören.

12. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivität von viralen Proteasen blockieren.

13. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten von zellulären Proteasen stören, die an der Virusreifung beteiligt sind.

14. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche ein breites Wirkspektrum besitzen und daher als neuartige Breitbandvirostatika zur Vorbeugung und/oder zur Therapie von unterschiedlichen Virusinfektionen eingesetzt werden.

15. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, die zelluläre Chaperone wie Hitzeschockproteine (*heat shock proteins* (hsp)) blockieren.

16. Mittel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten der Hitzeschockproteine Hsp40, Hsp70, 90, Hsp27 und Hsc70 hemmen.

17. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren zellulärer Chaperone Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen und deren Derivate angehören: Geldanamycin, Deoxyspergualin, 4-PBA oder Herbimycin A.

18. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Chaperone Substanzen eingesetzt werden, welche die Proteinkonformation und die Faltung von viralen Proteinen regulieren, stören oder blockieren.



19. Mittel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Chaperone Substanzen wie Glyzerol, Trimethylamine, Betain, Trehalose oder deuteriertes Wasser (D<sub>2</sub>O) eingesetzt werden.

20. Mittel nach Anspruch 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass als chemische Chaperone Substanzen eingesetzt werden, welche für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit unterschiedlichen humanpathogenen oder auch tierpathogenen Viren geeignet sind.

21. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Inhibitoren von molekularen Chaperonen oder von chemische Chaperonen Substanzen eingesetzt werden, welche für die Behandlung, Therapie und Hemmung von Infektionen mit Erregern von chronischen Infektionserkrankungen wie AIDS (HIV-1 und HIV-2), von Hepatitis (HCV und HBV), von dem Erreger des "Severe Acute Respiratory Syndroms" (SARS), dem SARS-CoV (Coronavirus), von Pockenviren, von Erregern des viralen hämorrhagischen Fiebers (VHF) wie den Ebola-Viren als Vertreter der Familie der Filoviridae; von Grippe-Erregern wie dem Influenza-A-Virus, geeignet sind.

22. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen der Ansprüche 1 bis 21 zur Hemmung der Assemblierung und der Reifung von Virusstrukturproteinen.

23. Verwendung von Inhibitoren nach Anspruch 22 zur Hemmung des Entry-/Internalisierungsvorganges, der Replikation sowie der Reifung und Freisetzung von *Flaviviridae*.

24. Verwendung von Inhibitoren nach Anspruch 22 und 23 zur Hemmung von späten Prozessen im Lebenszyklus von *Flaviviridae*.

25. Verwendung nach Anspruch 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Produktion von infektiösen Virionen von *Flaviviridae*-infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen durch Blockierung unterbinden.

26. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Hemmung der Freisetzung von Virionen wie auch eine nahezu vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen bewirken.

27. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen die Virusvermehrung und somit die Neuinfektion von Wirtszellen und damit die Ausbreitung einer Infektion *in vivo*, im Falle von Hepatitis-C-Virus im Lebergewebe eines Infizierten, unterdrücken.

28. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 bis 25 zur Hemmung der Vermehrung von *Flaviviridae* nach den Mechanismen

- a) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen
- b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen
- c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kulturen von Wirtszellen
- d) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in infizierten Organen *in vivo*.

29. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 28 zur Unterdrückung von Flavivirus-Infektionen und Pestivirus-Infektionen bei Menschen und Tieren.

30. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 27 zur Induktion des Absterbens von Hepato-Karzinomzellen.

31. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 30 zur Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzell-Karzinomen.

32. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 30 und 31 zur Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

33. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 30 bis 32 zur Behandlung /Bekämpfung /Verhinderung von

33.1. HCV-induzierter Leberzirrhose und/oder

33.2. HCV-induzierten Leberzellkarzinomen

33.3. Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen

33.4. genetisch bedingten Leberkarzinomen

33.5. durch Umwelt-bedingten Leberkarzinomen und/oder

33.6. durch eine Kombination viraler und nichtviraler Faktoren bedingten Leberkarzinomen.

34. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 30 bis 33 zur gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, welche infolge einer

34.1. HCV-Infektion oder

34.2. entsprechenden Koinfektion von HCV und HBV oder

34.3. HDV/HBV/HCV-Koinfektion

34.4. HIV/HCV-Koinfektionen oder

34.5. HCV und Koinfektionen mit anderen Viren, Bakterien, Parasiten entstehen.

35. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 28 und 29 zur Regeneration von Patienten nach Flavivirus-Infektionen.

36. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 29 und 35 zur Regeneration von Stalltieren nach Flavivirus- oder Pestivirus-Infektion.

37. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 30 bis 34 zur Reduktion der Anzahl infizierter Virus-produzierender Zellen im Leberzellgewebe.

38. Verwendung nach Anspruch 23 bis 25, 28 und 29 sowie 35 und 36, dadurch gekennzeichnet, dass Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen

Chaperonen die post-translationale Modifikation und proteolytische Prozessierung von *Flaviviridae*-Strukturproteinen verändern sowie die Dimerisierungsfähigkeit der Virus-Envelope-Proteine herabsetzen und dadurch die Freisetzung und Infektiosität von *Flaviviridae* herabsetzen oder blockieren.

39. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 38 zur Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer *Flaviviridae*-Infektion *in vivo*.

40. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 bis 39 in Kombination untereinander zur Behandlung und Bekämpfung von HCV bedingten Hepatitiden, Flavivirus bedingtem Fieber, Hämorrhagien und Encephalitiden sowie Pestivirus verursachten Krankheiten.

41. Verwendung nach Anspruch 39 und 40 in Kombination mit bereits in der antiviralen Therapie von *Flaviviridae*-Infektionen verwendeten Therapeutika.

42. Verwendung nach Anspruch 40 und 41 zur Behandlung von Koinfektionen verschiedener Flaviviren und Pestiviren.

43. Verwendung nach Anspruch 34 und 37 zur Behandlung von Koinfektionen von HCV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.

44. Verwendung nach Anspruch 43 zur Behandlung von HCV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie.

45. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 37 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Leber- und anderen Organtransplantationen.

46. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 45 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation.

47. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 45 und 46 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HCV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und sich neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

48. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 38 und 39 zur Vorbeugung einer *Flaviviridae*-Infektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, wie bei Ärzten, Risiko-Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für *Flaviviridae*, in der Krankenbehandlung oder für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

49. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von HCV bedingten Hepatitiden, Flavivirus bedingtem Fieber, Hämorrhagien und Encephalitiden sowie Pestivirus verursachten Krankheiten.

50. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22, 30 und 34 zur Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo*.

51. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 27, 37, 40, 49 und 50 in Kombination untereinander zur Behandlung und Bekämpfung von Hepatitiden.

52. Verwendung nach Anspruch 51 in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika.

53. Verwendung nach Anspruch 37 und 50 zur Behandlung von Koinfektionen mit HBV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.

54. Verwendung nach Anspruch 53 zur Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie.

55. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 49 zur Herstellung von Mitteln und/oder pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren.

56. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 55 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatitiden.

57. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren.

58. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren sowie von Hepatitisviren.

59. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 58 zur Hemmung von späten Prozessen im Replikationszyklus von Retroviren sowie von Hepatitisviren.

60. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Assemblierung und Freisetzung von Virionen von der Zelloberfläche gehemmt werden.

61. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 22 und 57 bis 59, dadurch gekennzeichnet, dass im Falle von Retroviren die proteolytische Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease gehemmt wird.

62. Verwendung von Inhibitoren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Spumaviren oder
- b) Mammalian C-Typ Oncoviren oder
- c) BLV (Bovine Leukemia Virus) oder
- d) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) oder
- e) Leukämieviren oder
- f) RSV (Rous Sarcoma Virus) Viren oder
- g) Lentiviren

gehemmt werden.

63. Verwendung nach Anspruch 62d, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) HTLV-I oder
- b) HTLV-II

gehemmt werden.

64. Verwendung nach Anspruch 62g, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Humanes Immundefizienzvirus Type 1 (HIV-1) oder
- b) Humanes Immundefizienzvirus Type 2 (HIV-2) oder
- c) Affenimmundefizienzvirus (SIV) oder
- d) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV)
- e) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV)

gehemmt werden.

65. Verwendung von Inhibitoren zellulärer Chaperone oder von chemischen Chaperonen nach Anspruch 61 zur Bekämpfung / Behandlung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit Retroviren verursacht wurden.

66. Verwendung nach Anspruch 62g) zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS.

67. Verwendung nach Anspruch 66 in Kombination mit

67.1. anderen anti-retroviralen Medikamenten

- 67.2. Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease
- 67.3. anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen
- 67.4. intrazellulärer Immunisierung
- 67.5. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und/oder peripheren CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

68. Verwendung nach Anspruch 66 zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS in fortgeschrittener Krankheitsphase.

69. Verwendung nach Anspruch 66 zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2 infizierten Personen.

70. Verwendung nach Anspruch 66 zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia-, und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns.

71. Verwendung nach Anspruch 66 zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1-/HIV-2-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.



## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von akuten und chronischen Infektionen mit für Mensch und Tier pathogenen Viren, die an der Zellmembran assemblieren und durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Hierzu zählen insbesondere Erreger von Infektionserkrankungen wie AIDS, Hepatitis, hämorrhagisches Fieber, SARS, Pocken, Masern, Polio oder Grippe. Gegenstand der Erfindung sind Mittel, die als Wirkstoffe Inhibitoren der Proteinfaltung enthalten. Hierzu zählen Inhibitoren von zellulären Faltungsenzymen (den enzymatischen Chaperonen) wie auch Substanzen, welche die Faltung von Proteinen durch chemische Chaperone stören. Dazu gehören folgende Substanzklassen und ihre Derivate: Geldanamycin, Deoxyspergualin, 4-PBA oder Herbimycin A. Durch diese Mittel werden die hoch organisierten Prozesse der Assemblierung und der proteolytischen Reifung von Virusstrukturproteinen gestört. Im Ergebnis wird die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Nachkommenviren unterbunden.